Ueber die Urease der Samen von Robinia pseudacacia

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
genehmigt
von der Philosophischen Fakultät
der
Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

Von

Pin Yin Yi
aus China

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Tag der Promotion: 24. November 1919

75

Referenten: Prof. Dr. **Thoms**
Prof. Dr. **Beckmann**

Emil Ebering, Berlin NW 7, Mittelstraße 29

Dem Andenken meiner Eltern

Allgemeiner Teil

Das Ferment Urease wurde von Beijerinck[1] in den harnstoffspaltenden Bakterien entdeckt und von ihm als ein in Wasser unlösliches, an den Bakterienleib gebundenes Enzym beschrieben. Später wurde die Urease auch in vielen Pilzen, dann in Samen und Keimpflanzen nachgewiesen. So fanden sie Shibata[2] und Fosse[3] in Aspergillus niger, Kossowicz[4] in Aspergillus glaucus, Penicillium crustaceum, Mucor Boidin und Tamau Kikkoji[5] im japanischen Hutpilz Cortinellus edodes.

Takeuchi[6] beobachtete Urease in der Phaseolusbohne, im Hafer, ungeschälten Reis und Buchweizen, Kan Kato[7] in Bambusschößlingen, Falk[8] in dem Rizinussamen, Muenk[9]

---

1. Beijerinck: Centr. Bl. f. Bakter. u. Parasitenk. II. 7. 33—61. Ch. C. 1901. I. 587.
2. Shibata: Beiträge zur chem. Physiol. und Path. 5. 384. (1904)
3. Fosse: Compt. rend. de l'Acad. des sciences 158. 1374. Ch. C. 85. II. 51.
4. Kossowicz, Effront, Les catalysateurs biochimiques dans la vie et dans l'industrie 567. 1914. Paris.
5. Kikkoji, Zeitschr. f. physiol. Chemie 51. 201. (1907)
6. Takeuchi, Journ. of the Coll. of. agric. Tokyo. 1. 1. (1909) Ch. C. 80. 1909. II. 635.
7. Kan Kato. Zeitschr. f. physiol. Chemie 75. 462. (1911)
8. Falk, Journ. of Americ. Chem. Soc. 35. 292. (1912)
9. Muenk: Landw. Versuchsstat. 85. 393. (1912)

in den Samen und Kiesel[10] in den teilweise etiolierten Pflänzchen der weißen und blauen Lupine und den Weizenkeimlingen. Fosse[11] hat dann dieses Enzym auch in der Melone, Klee, Rübe, Hafer, Mandeln usw., Annett[12] in großer Menge in der Schwertbohne (Canavalia ensiformis), dann in Dolichos biflora und Urena Lobata festgestellt.

In den Getreidesamen und im Stroh wurde in allerjüngster Zeit von Némec[13] das Vorkommen von Urease mit Sicherheit nachgewiesen, während Zemplén[14] in Gramineen-Samen das Ferment nicht auffinden konnte. Dieser Forscher stellte aber in sehr vielen Papilionaceen-Samen das Enzym fest, in sehr erheblicher Menge in den Samen von Robinia pseudacacia, der sogenannten Akazie. Zemplén[15] schlug sogar vor, die Urease der Robiniensamen technisch zu verwenden und empfahl die fabrikmäßige Herstellung von Ammoniumsulfatdünger aus Harn mit Hilfe dieser Samen. Nach Zemplén berichtete dann Wakulenko[16] über die Spaltbarkeit des Harnstoffes durch die Robiniensamen = Urease.

Zemplén studierte die harnstoffspaltende Kraft der Akaziensamen, indem er 1 gr der gepulverten Samen 1 bis 10 Tage auf 1 bis 3 %ige Harnstofflösungen bei Zimmertemperatur einwirken ließ, sodann aus dem Reaktionsprodukt nach Zusatz von 25 ccm Kalkmilch das entstandene

---

10. Kiesel: Zeitschr. f. physiol. Chemie 75. 169. (1911)

11. Fosse: Soc. Biol. 77. 129. (1914) Compt. rend. 158. 1076. (1915) Biochem. Centr. Bl. 17. 299; 18. 487.

12. Annet: Bioch. Journal 8. 449 (1914) C. C. 87. I. 1076.

13. Némec: Biochem. Zeitschr. 91. 126. (1918)

14. Zemplén: Zeitschr. f. physiol. Chem. 79. 229. (1912)

15. Zemplén: Zeitschrift für angew. Chemie 25. II. S. 1560. (1912)

16. Wakulenko: Landwirtsch. Versuchsstat. 82. 313. Ch. C. 1914, I. 1959. (1914.)

Ammoniak abdestillierte, dieses in einem bestimmten Volumen Normal-Schwefelsäure auffing und seine Menge durch Rücktitration der Säure bestimmte. Zemplén war es bereits nicht unbekannt, daß schon reine Harnstofflösungen beim Kochen mit Kalkmilch Ammoniak abspalten, und er berücksichtigte diese Tatsache. Er zog nämlich von der gefundenen Gesamt-Ammoniakmenge den Betrag ab, den er bei der Destillation einer ebensolchen reinen Harnstofflösung mit derselben Menge Kalkmilch erhielt. Die beim Kochen von Harnstofflösung und Kalkmilch entstehenden NH_3 Mengen können aber durch verschiedene Einflüsse wohl sehr schwanken. Außerdem hat Zemplén die aus dem Eiweißstoff bei der Destillation mit Aetzkalk sich entwickelnde Ammoniakmenge nicht genügend berücksichtigt. Diese beiden gegen die Methode von Zemplén bestehenden Bedenken hat soeben auch Némec[13] in seiner mir kurz vor Abschluß dieser Arbeit bekannt gewordenen Abhandlung: „Ueber die Verbreitung der Urease in den Getreidesamen“ ausgesprochen.

Auf Veranlassung von Herrn Geheimrat Thoms habe ich in dem von ihm geleiteten pharmazeutischen Institut der Universität Berlin mich bemüht, ein neues und sicheres Verfahren zur Erkennung der Wirksamkeitsgröße der Robinienurease auszuarbeiten. Ich stellte Versuche an über die harnstoffspaltende Kraft des Samenpulvers, die Möglichkeit der Isolierung der Urease und ihren Uebergang aus dem Pulver in verschiedene Salzlösungen und in reines Wasser bei höherer Temperatur. Endlich studierte ich noch die Einwirkung des Fermentes auf die Alkylderivate des Harnstoffes.

Die für die Versuche bestimmten, auf der Handmühle fein gepulverten Samen von Robinia pseudacacia (chinesischer Name: Kin Giau Fa Ds), ebenso das in ihnen enthaltene Oel wurden vor allem zur näheren Charakterisierung sorgfältig untersucht. Auf Grund der Analyse

können Robiniensamen als ein gutes Nahrungsmittel angesprochen werden. Sie sind auch frei von Alkaloiden.

Die Möglichkeit, die Wirksamkeit der Urease richtig zu erkennen, war erst gegeben nach der Festlegung eines einwandfreien Verfahrens zur quantitativen Bestimmung des bei der Harnstoffzerlegung gebildeten Ammoniaks. Ich konnte die obige Angabe von Zemplén[14] und von Némec[13] über die Ammoniakspaltung aus Harnstoff durch Kochen mit Kalkmilch bestätigen, weiter konnte ich selbst beim einfachen Kochen einer reinen Harnstofflösung eine Entwicklung von Ammoniak beobachten, so daß es angebracht schien, das Kochen einer Harnstofflösung bei Austreibung des in ihr enthaltenen freien Ammoniaks zu vermeiden. Auf Grund meiner Versuche ist es aber möglich, durch zweistündiges Leiten von Luft durch eine Harnstoff und Ammoniak oder Ammoniumkarbonat enthaltende Lösung bei 80° das Ammoniak quantitativ überzudestillieren, ohne daß dabei eine Störung durch eine Zersetzung des Harnstoffes stattfindet. Indem ich das überdestillierende Ammoniak in einer bekannten Säure auffing und den Ueberschuß der Säure sodann zurücktitrierte, konnte ich seine Menge und weiter die des gespaltenen Harnstoffes erkennen. Im Verlaufe meiner Arbeit fand ich noch eine bedeutend einfachere und ebenfalls genau arbeitende Bestimmungsmethode des entwickelten Ammoniaks in der direkten Titration des ammoniakhaltigen Reaktionsproduktes mit Normal-Säure bei Gegenwart von Dimethylaminoazobenzol als Indikator. Die Titration läßt sich direkt in der Harnstoff enthaltenden Flüssigkeit neben Samenpulver oder nach der Trennung von letzterem durch Filtration ausführen. Sind die Reaktionsprodukte dunkel gefärbt, so kann durch Verdünnen mit Wasser ihre Farbe aufgehellt und der Umschlag dann bei der Titration deutlicher erkannt werden.

Ließ ich 0,2—1,0 gr des Samenpulvers verschiedene

Zeiten auf eine Lösung von 2 gr Harnstoff in 100 ccm Wasser bei Zimmertemperatur einwirken, so beobachtete ich eine mit der Menge des verwendeten Samenpulvers und der Dauer der Einwirkung ansteigende Harnstoffzerlegung, die sich bei den parallelen Versuchen bei 37° C. noch weiter erhöhte.

Eine ähnliche Beschleunigung der Harnstoffzerlegung bei höherer Temperatur hat bereits Beijerinck[1] beobachtet bei den Urease enthaltenden Bakterien. Er fand die beste Wirkung der Urease von Urococcus ureae bei 45 — 50°.

Durch Zusatz von Alkohol zur Harnstofflösung wurde die Harnstoffspaltung vermindert. Bei der Einwirkung von Leinsamenmehl auf eine Harnstofflösung unter denselben Bedingungen war keine Ammoniakbildung nachweisbar.

Das so in dem Samenpulver nachgewiesene, harnstoffspaltende Prinzip versuchte ich nun zu isolieren durch Fällung mit verschiedenen Mitteln aus wässerigen Auszügen der Droge. Es sollte als Fällungsmittel Alkohol und auch Aceton Verwendung finden. Die Wirksamkeit der so erhaltenen Substanzen kam keineswegs der Wirksamkeit der entsprechenden Menge des Pulvers gleich. Erstens bleibt nämlich bei der Extraktion ein nicht geringer Teil des Fermentes in der Droge zurück; weiter sind Verluste an Ferment bei der Abscheidung aus technischen Gründen unvermeidbar, und endlich übt Alkohol einen schädigenden Einfluß auf das Ferment aus. Durch entsprechende Versuche konnte die Richtigkeit dieser drei Erklärungen der geringen Wirkung der abgeschiedenen Menge dargetan werden. Ein mit Aceton ausgefälltes Ferment hatte seine Wirksamkeit überhaupt vollkommen verloren, ebenso ein mit Bleiacetat aus dem wässerigen Auszug niedergeschlagenes. Etwas besser war das Ergebnis einer Fällung mit Natriumchlorid und dann mit Ammoniumsulfat, wenn es auch immer noch hinter dem vorher bei Verwendung von Alkohol zur

Abscheidung erhaltenen zurückblieb. Es erscheint so nicht möglich, ein Ferment aus dem Samenpulver zu gewinnen, das letzterem an Wirksamkeit auch nur einigermaßen gleichkommt, und daher ist es vielleicht angezeigt, bei den Versuchen über die harnstoffspaltende Kraft der Robiniensamenurease entweder das Samenpulver direkt oder einen wässegen Auszug desselben zu verwenden.

Im weiteren Verlaufe meiner Arbeit stellte ich noch Untersuchungen dahin an, welche Salze den Uebergang der Urease aus dem Samenpulver in die Extraktionsflüssigkeit erhöhen. Das günstigste Resultat erzielte ich beim Ausziehen mit einer 5 prozentigen Natriumacetatlösung. Sich anschließende Arbeiten ergaben, daß durch Erwärmen die Extraktionsfähigkeit der Urease ebenfalls gesteigert wird. Am günstigsten erwies sich die Temperatur von 45°, während bei höherem Erhitzen scheinbar eine Schädigung des Fermentes eintrat, und bei 80° C. dessen Wirksamkeit beinahe gänzlich aufgehoben wurde. Daß durch Erhitzen die Aktivität von Enzymen herabgesetzt wird, hat schon Schoenbein[17] beobachtet. In einem mit 10 % Alkohol versetzten, wässerigen Auszug des Drogenpulvers trat beim Erwärmen auf 45° C. bereits eine Fällung ein, die sich beim weiteren Erhitzen immer mehr vergrößerte und bei 80° beendet war. Auch hier enthielt aber noch die von dem Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit geringe Mengen harnstoffspaltender Substanz.

Während nach Takeuchi[6] die von ihm mit Wasser aus der Sojabohne extrahierte Urease nur auf Harnstoff wirkt und nicht auf verwandte Verbindungen, konnte ich bei der Robiniensamenurease eine spaltende Wirkung sowohl auf asymmetrischen Dimethyl- wie Diaethyl-Harnstoff beobachten. Die entsprechenden symmetrischen Verbindungen wurden im Gegensatz dazu nicht zersetzt.

---

17. Schoenbein: Journ. f. prakt. Chemie. 89. 0340. (1863)

Versuchs-Teil

1. Analyse der verwendeten Samenpulver von Robinia pseudacacia und des in ihm enthaltenen fetten Oeles.

Die zur Ausführung der Arbeit verwendeten Samen von Robinia pseudacacia wurden einer Analyse unterworfen, die folgende Werte ergab:

Wasser	9,01 %
Asche	3,78 %
Fett	11,55 %
Phosphorsäure	1,26 %
Stickstoff	6,075 %

Hieraus berechnet:

Eiweiß	37,969 %

Ein Alkaloid konnte nach dem Verfahren von Stas-Otto nicht nachgewiesen werden.

Man extrahierte 20 gr der zu einem Pulver gemahlenen Samen mit einer Lösung von 0,5 gr Weinsäure in 99,5 gr Alkohol von 90 % durch dreistündiges Kochen auf dem Wasserbade. Die Lösung wurde sodann von dem Pulver abfiltriert und zur Trockene auf dem Wasserbade eingedampft. Den Rückstand löste ich in wenig Wasser und klärte die Lösung durch Filtrieren.

Einen Teil des Filtrates machte man mit Natronlauge alkalisch und schüttelte sodann mit Aether aus. Die Lösung des beim Verdunsten des Aethers erhaltenen Rückstandes in verdünnter Schwefelsäure gab nach der Filtration auf Zusatz von Kaliumwismutjodidlösung keinen Niederschlag.

Einen zweiten Teil des Filtrates schüttelte man nach der Alkalisierung mit Chloroform aus, verdunstete das Chloroform, nahm den Rückstand mit verdünnter Schwefelsäure auf und klärte die Lösung durch Filtration. Auch in dieser Lösung entstand durch Kaliumwismutjodid keine Fällung.

Den Extraktgehalt ermittelte ich sowohl durch Ausziehen in der Wärme als auch bei Zimmertemperatur.

Im ersteren Falle extrahierte man 5 Gramm des Samenpulvers mit 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung 3 Tage lang bei 50° C. auf dem Wasserbade, filtrierte die Lösung von dem Pulver ab und wusch den Filterrückstand mit Wasser nach. Die vereinigten Filtrate ergaben beim Eindampfen zur Trockene nach Abzug der NaCl-Menge einen Rückstand von 1,28 gr. Daraus berechnet sich das nach der warmen Methode erhaltene Extrakt gleich 26,6 % der angewandten Substanz.

Bei einer ebenso ausgeführten Extraktion bei Zimmertemperatur wurden aus 5 gr Samenpulver 0,8036 gr Extrakt erhalten, was 16,07 % der angewandten Substanz entspricht.

Das mittels Aether aus dem Samenpulver extrahierte und auf dem Wasserbade von Aether befreite Oel zeigte folgende Konstanten:

Spez.-Gewicht = 0,927
Säurezahl = 5,248

(1 0,22 g Oel: 1,912 ccm n/$_2$ KOH)
Verseifungszahl = 200,3

(1,607 g Oel: 11,47 ccm ½ KOH)
Esterzahl: 195,05
Jodzahl: 155,95

(0,193 g Oel: 23,688 ccm Jodlösung, die in ccm 0,012692 Gramm J enthält.)

2. Verfahren zum quantitativen Nachweis des durch die Urease abgespaltenen Ammoniaks.

Der Hauptzweck meiner Arbeit war das Studium der in dem Samen enthaltenen Urease und deren Zerlegungsfähigkeit für Harnstoff und seine Alkylderivate. Da ich, gemäß dem Verfahren von Zemplén[15] das bei der Einwirkung von Urease auf Harnstoff gebildete Ammoniak durch Kalkmilch aus dem Reaktionsgemisch austreiben wollte, mußte vorher auch geprüft werden, ob und in welchem Umfang durch Kalkmilch allein eine Ammoniak-Abspaltung des Harnstoffes bewirkt wird.

1 gr Harnstoff wurde mit 10 ccm Kalkmilch und 200 ccm Wasser eine Stunde auf dem kochenden Wasserbade erhitzt und die entweichenden Dämpfe nach der Kondensation im Liebigschen Kühler in 20 ccm $n/_1$ Schwefelsäure aufgefangen. Zur Titration der vorgelegten Säure waren nachher nur 19,4 ccm $n/_1$ Kalilauge erforderlich unter Verwendung von Nitrophenol als Indikator. 0,6 ccm der Lauge waren also bereits durch entweichendes Ammoniakgas abgesättigt worden, die 0,6 . 0,01703 gr = 0,010218 g NH_3 entsprechen.

Bei zwei weiteren Versuchen unter sonst gleichen Bedingungen lagen je 33,27 ccm $n/_{10}$ (30 ccm vom F. 1,109) Schwefelsäure vor und wurde das Erhitzen des Reaktionsgemisches einmal zwei und einmal drei Stunden lang durchgeführt. Nach dem zweistündigen Erhitzen neutralisierten 18,03 $n/_{10}$ Kalilauge die vorgelegte Säure, woraus sich die Menge des entwichenen NH_3 ergibt gleich (33,27 — 18,03) · 0,001703 = 0,025954 g; nach dreistündigem Erhitzen waren zur Rücktitration 12,3 ccm $n/_{10}$ Lauge nötig, daraus berechnet sich das überdestillierte NH_3 gleich (33,27 — 12,42). 0,001703 = 0,03551 g.

Beim zweistündigen Erhitzen bei 100° einer Lösung

von 1 g Harnstoff und 20 ccm Kalkmilch (also der doppelten Menge der obigen Versuche) auf 200 ccm Wasser neutralisierte das entweichende Ammoniak 18,7 ccm der vorgelegten $n/_{10}$ Säure; es waren somit 18,7. 0,001 703 g = 0,03 185 g NH_3 überdestilliert. Zur weiteren Bestätigung der bei vorstehenden Versuchen beobachteten Zerlegung des Harnstoffes sollten die Versuche wiederholt werden unter Benutzung einer Kalkmilch von bekanntem Wert.

Es ergab sich durch Titration der Gehalt der Kalkmilch an $Ca(OH)_2$ = 1,504 %.

(Zur Neutralisation einer Lösung von 10 ccm der gut umgeschüttelten Kalkmilch in 20 ccm $n/_1$ Salzsäure waren 15,94 ccm $n/_1$ Kalilauge erforderlich. Somit hatten die 10 ccm Kalkmilch 4,06 ccm der Säure gebunden und beträgt der Gehalt der Milch an $Ca(OH)_2$ 4,06. 0,037045. 10 % = 1,504 %).

Während eines zweistündigen Erhitzens bei 100° auf dem Wasserbade von 1 g Harnstoff und 200 g Wasser mit 10 ccm der bekannten Kalkmilch entwichen 0,0323 g NH_3, mit 25 ccm Kalkmilch 0,04561 g NH_3.

(Bei Zusatz von 10 ccm Kalkmilch waren zur Rücktitration der vorgelegten 33,27 ccm $n/_{10}$ (30 ccm vom F. 1,109) Schwefelsäure erforderlich 14,3 ccm $n/_{10}$ Kalilauge. Das Ammoniak hatte somit 18,97 der Säure gebunden, woraus sich seine Menge gleich 18,97. 0,001 703 = 0,0323 berechnet; bei Zusatz von 25 ccm Kalkmilch waren zur Rücktitration 6,49 ccm $n/_{10}$ Lauge erforderlich, somit waren (33,27 — 6,49). 0,001 703 = 0,04 561 g NH_3 überdestilliert.)

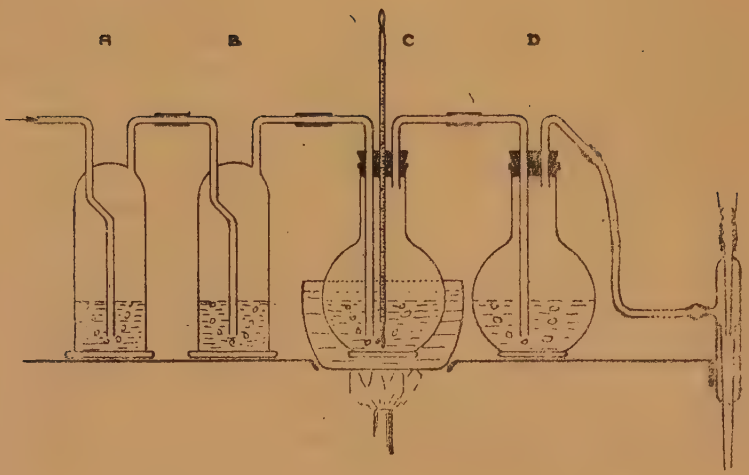
Durch diese Versuche war eine Zersetzung des Harnstoffes beim Erhitzen seiner wässerigen Lösung auf 100° mit Kalkmilch sicher erwiesen und zugleich die Methode von Zemplén[15] zur Bestimmung der Zerlegungsfähigkeit der Urease gegenüber Harnstoff als unanwendbar erkannt wor-

den. Daher war es nötig, ein brauchbares Verfahren zur Ermittelung der Wirkung der Urease auf Harnstoff auszuarbeiten. Vor allem war festzustellen, ob nicht schon kochendes Wasser allein eine Zerlegung des Harnstoffes in störendem Grade verursachen kann. Ich erhitzte 1 g Harnstoff mit 200 g Wasser in dem auf 100° erwärmten Wasserbade zwei Stunden lang und leitete die durch einen Kühler kondensierten Dämpfe in 33,27 ccm (30 ccm vom F. 1,109) $n/_{10}$ Schwefelsäure. Nach Beendigung des Versuches waren zur Rücktitration der vorgelegten Säure nur 19,78 ccm $n/_{10}$ KOH-Lösung erforderlich, so daß durch das überdestillierte Ammoniak 13,49 ccm der Säure gebunden worden waren, woraus sich eine Ammoniakmenge berechnet von 0,001 703. 13,49 g = 0,023 g. Somit wird also Harnstoff schon beim Erhitzen mit Wasser in merklichem Maße unter Entwicklung von Ammoniak zersetzt.

Es war nun festzustellen, ob nicht bei niedrigerer Temperatur ein vollkommenes Ueberdestillieren des Ammoniaks möglich sei, bei der aber der Harnstoff noch nicht durch das Wasser gespalten wird. Um das Entweichen des Ammoniaks zu erleichtern, leitete ich einen langsamen Luftstrom durch die auf die bestimmte Temperatur erhitzte Flüssigkeit. Der Luftstrom war zuvor zur Reinigung durch konzentrierte Kalilauge und sodann durch Schwefelsäure geleitet. Hierauf passierte er die Ammoniak oder Harnstoff enthaltende Lösung und mußte weiter seinen Weg durch die vorgelegte bekannte Säure nehmen.

In die Lösung war ein Thermometer eingehängt zur Erkennung ihres Wärmegrades.

Beiliegende Figur möge meinen Versuch erläutern.



Der Kolben (C) wurde mit einer Ammoniaklösung beschickt von bekanntem Gehalt. Zu ihrer Herstellung ergänzte man 50 ccm der 10 %igen Ammoniaklösung im Maßkolben auf 500 ccm mit Wasser und ermittelte den Wert des Gemisches durch indirekte Titration. Nachdem 50 ccm desselben mit 33,27 ccm (30 ccm vom F. 1,109) $n/_1$ Schwefelsäure versetzt waren, waren zur Neutralisation der noch freien Säure bei Verwendung von Nitrophenol als Indikator noch 12,97 ccm $n/_1$ Kalilauge erforderlich. Die 50 ccm der Lösung enthielten somit (33,27 — 12,97). 0,01703 g = 0,3457 g Ammoniak. Zu den folgenden Versuchen wurden je 50 ccm dieser Ammoniaklösung mit 150 ccm Wasser in den Kolben gegeben und dieser je 2 Stunden auf eine bestimmte Temperatur erhitzt, während der Luftstrom hindurchzog. Vorgelegt waren je 33,27 ccm (30 ccm vom F. 1,109) $n/_1$ Schwefelsäure in dem Kolben D. Er war

mit der Wasserstrahlpumpe zum Hindurchsaugen der Luft verbunden. Diese wurde in dem Gefäß A durch konzentrierte Kalilauge zur Befreiung von Kohlensäure geleitet, in dem Gefäße B durch konzentrierte Schwefelsäure, um etwa enthaltenes Ammoniak zu binden. Die Luft schickte man mit solcher Schnelligkeit durch die Gefäße, daß die Luftblasen gerade noch gezählt werden konnten.

Nach dem Erhitzen auf 55° waren zur Rücktitration der Säure nötig, 17,8 ccm $n/_1$ Kalilauge; überdestilliert waren (33,27 — 17,8). 0,01703 g = 0,2634 g Ammoniak.

Nach dem Erhitzen auf 75° waren zur Rücktitration der Säure nötig 14,29 ccm $n/_1$ Kalilauge; überdestilliert waren (33,27 — 14,29). 0,01763 g = 0,3232 g Ammoniak.

Nach dem Erhitzen auf 80° waren zur Rücktitration der Säure nötig 13,19 ccm $n/_1$ Kalilauge; überdestilliert waren (33,27 — 13,19). 0,01703 g = 0,342 Ammoniak.

Nach dem Erhitzen auf 90° waren zur Rücktitration nötig 13,15 ccm $n/_1$ Kalilauge; überdestilliert waren (33,27 bis 13,15). 0,01703 g = 0,3426 g Ammoniak.

Bei 80° war somit das Ammoniak durch das zweistündige Durchleiten von Luft beinahe vollkommen in die vorgelegte Säure übergeführt worden. Daß auf diese Weise auch aus einer Ammoniumkarbonatlösung das an Kohlensäure gebundene Ammoniak gleichfalls überdestilliert perden kann, zeigen noch folgende Versuche: Eine Lösung von Ammoniumkarbonat des Handels 1 : 50 kochte man $^3/_4$ Stunden mit überschüssiger Natronlauge und leitete die entweichenden Dämpfe zur Bindung des Ammoniaks durch 19,4 ccm $n/_1$ Schwefelsäure. Bei der Rücktitration der vorgelegten Säure verbrauchte ich 6,8 ccm $n/_1$ Kalilauge. Somit waren aus der Hirschhornsalzlösung (19,4 — 6,8). 0,01703 gr = 0,2146 g NH_3 überdestilliert. Aus weiteren 50 ccm einer zweiprozentigen Ammoniumkarbonatlösung führte man

wie oben bei der Ammoniaklösung das Ammoniak durch zweistündiges Durchleiten von Luft in die vorgelegte Säure über. Zur Rücktitration der 19,4 $n/_1$ Schwefelsäure waren 7,3 ccm $n/_1$ Kalilauge nötig, woraus sich eine Ammoniakmenge von (19,4 — 7,3). 0,01703 g = 0,2061 g berechnet. Die in den beiden Versuchen gefundenen Ammoniakmengen stimmen soweit überein, als es von den so verschiedenen Methoden überhaupt erwartet werden konnte.

Auf Grund dieser Ergebnisse erschien es wohl möglich, bereits bei der Temperatur von 80° nach dem angegebenen Verfahren das Ammoniak ziemlich quantitativ — soweit es eben für die weitere Arbeit nötig ist — auszutreiben.

Es war noch zu prüfen, ob nicht auch bei dieser Temperatur bereits eine Zersetzung des Harnstoffes durch das Wasser in solchem Grade stattfindet, daß dadurch eine Störung bei den folgenden Untersuchungen sich ergeben könnte. Der Kolben wurde beschickt mit einer Lösung von 1 g Harnstoff auf 200 g Wasser und derselbe Versuch wie oben wieedrholt, wobei einmal auf 80° und das andere Mal auf 90° erhitzt wurde. Die Vorlagen (D) enthielten 33,27 ccm $n/_{10}$ (30 ccm vom F. 1,109) Schwefelsäure.

Nach dem Erhitzen auf 80° waren zur Rücktitration der Säure nötig 32,53 ccm $n/_{10}$ Kalilauge; überdestilliert waren (33,27 — 32,53). 0,001 703 g = 0,00126 g Ammoniak.

Nach dem Erhitzen auf 90° waren zur Rücktitration der Säure nötig 31,21 ccm $n/_{10}$ Kalilauge; überdestilliert waren (33,27 — 31,21). 0,001703 g = 0,0035 g Ammoniak.

Während früher beim Erhitzen einer wässerigen Harnstofflösung auf 100° eine erhebliche Zersetzung des Harnstoffes durch das Wasser sich ergeben hatte, erschien diese Harnstoff-Spaltung bei 80° so gering, daß von ihr keine merkliche Störung zu befürchten war. Es bestand somit die

Möglichkeit, Ammoniak aus einer wässerigen Harnstofflösung vollkommen überzudestilliieren, ohne daß durch Zersetzung des Harnstoffes während der Destillation eine merkliche Ammoniak-Entwicklung zu befürchten war und zwar durch zweistündiges Erhitzen der Lösung auf 80°, wodurch nach dem früheren Versuch das Ammoniak beinahe quantitativ übergetrieben wird. Um die Richtigkeit dieser Annahme nochmals zu prüfen, wurden 50 ccm der bekannten, bereits zu den obigen Versuchen benützten Ammoniaklösung mit 1 gr Harnstoff und 150 ccm Wasser zwei Stunden auf 80° erhitzt unter Durchtreiben des Luftstromes. Vorgelegt waren 33,27 $n/_1$ (30 ccm vom F. 1,109) Schwefelsäure. Bei der Rücktitration der Säure wurden nach Beendigung des Erhitzens verbraucht 13,63 ccm $n/_1$ Kalilauge. Somit waren (33,27 — 13,63). 0,01703 g = 0,3385 g Ammoniak überdestilliert, also beinahe vollkommen das freie Ammoniak, während eine Störung des Versuches durch Bildung von Ammoniak infolge Harnstoffzersetzung nicht eingetreten war.

Im Verlaufe meiner Arbeit fand ich noch eine bedeutend einfachere und nach meinen Feststellungen ebenso sichere Bestimmungsmethode des entwickelten Ammoniaks in der direkten Titration des ammoniakhaltigen Reaktionsproduktes mit Normalschwefelsäure unter Verwendung von Dimethylaminoazobenzol als Indikator. Die Titration läßt sich direkt bei Gegenwart des ungespaltenen Harnstoffes und des Samenpulvers ausführen oder in den Filtraten. Sind die Reaktionsprodukte infolge einer erheblichen Ammoniakabspaltung dunkel gefärbt, so empfiehlt sich ein Verdünnen der Filtrate mit Wasser, wodurch die Farbe aufgehellt und der Umschlag bei der Titration deutlicher sichtbar wird. Daß die Gegenwart von Harnstoff diese Titration nicht stört, bewies folgender Versuch: Einer Lösung von 1 g Harnstoff auf 100 ccm Wasser wurde Dimethylaminoazo-

benzol und sodann ein Tropfen Normal-Schwefelsäure zugefügt, wodurch die Flüssigkeit sich sofort rot färbte. Somit ist die Möglichkeit gegeben, Ammoniak oder Ammoniumkarbonat in Lösung neben Harnstoff direkt titrimetrisch zu bestimmen mit Normal-Schwefelsäure bei dem Indikator Dimethylaminoazobenzol.

---

3. Spaltung des Harnstoffes durch das Samenpulver.

Diese Methoden gestatten es somit, den Gehalt einer Harnstofflösung an Ammoniak zu ermitteln und sie konnten benutzt werden, um die Wirksamkeit des Akazienfermentes Urease gegenüber Harnstoff festzustellen. Man ließ verschiedene Mengen des Samenpulvers auf eine Lösung von 2 g Harnstoff in 100 ccm Wasser verschiedene Zeiten bei Zimmertemperatur einwirken und filtrierte sodann die Lösung von dem Drogenpulver ab; 25 ccm des Filtrates (= $^1/_4$ des Gesamt-Filtrates) wurden mit 100 ccm Wasser verdünnt und ihr Gehalt an Ammoniak nach dem vorher angegebenen Verfahren bestimmt.

Bei Verwendung von von Samenpulver in Gramm	und einer Dauer der Einwirkung von	fanden sich am Gesamt-Filtrat gr. NH_3
0,2	1 Tag	0,04428
0,2	2 Tagen	0,06744
0,25	3 Tagen	0,11104
1,0	1 Tag	0,1696
1,0	2 Tagen	0,2718
1,0	3 Tagen	0,3726
1,0	5 Tagen	0,5934
1,0	7 Tagen	0,97003
1,0	3 Wochen	0,9995

Wurde die Lösung von 2 g Harnstoff auf 100 g Wasser bei gewöhnlicher Temperatur 7 Tage stehen lassen, so war dabei keine Ammoniakbildung nachweisbar. Die bei den anderen Versuchen mit dem Samenpulver beobachtete Entstehung von Ammoniak konnte also nur auf die diesem Pulver eigene Fähigkeit, den Harnstoff zu zersetzen, zurückgeführt werden. Die erhaltenen Ammoniakmengen näherten sich erst nach einer siebentägigen Einwirkung des Pulvers der bei einer vollkommenen Spaltung des Harnstoffes sich ergebenden Ammoniakmenge von 1,134 g. Es war aber eine Beschleunigung dieser Harnstoffzerlegung zu erwarten bei Anwendung einer höheren Temperatur, welche die Tätigkeit des Fermentes günstig beeinflussen konnte.

Ich führte folgende Versuche analog den obigen aus, nur ließ ich die Reaktion nicht bei Zimmertemperatur, sondern bei 37° im Brutschrank vor sich gehen.

Bei Verwendung von Samenpulver in gr.	und einer Dauer der Einwirkung von	fanden sich im Filtrat gr. NH_3
0,1	10 Tagen	0,4343
0,2	10 Tagen	0,6641
0,3	10 Tagen	0,8345
0,4	10 Tagen	1,0473
0,5	2 Tagen	0,4343
0,5	4 Tagen	0,7493
0,5	7 Tagen	0,9877
0,5	10 Tagen	1,1070
1,0	1 Tag	0,4555
1,0	2 Tagen	0,8386
1,0	3 Tagen	0,9482

Damit ergibt sich eine wesentliche Beschleunigung der Harnstoff-Zerlegung bei Brutschrankwärme gegenüber Zim-

mertemperatur. In den sich anschließenden Versuchen, die sonst vollkommen analog den letzteren ausgeführt wurden, benützte ich anstatt reinen Wassers ein Gemisch von 10 ccm Alkohol und 90 ccm Wasser.

BeVerwendung von Samenpulver in Gramm	und einer Dauer der Einwirkung von	fanden sich im Filtrat gr. NH_3
0,5	2 Tagen	0,3406
0,5	4 Tagen	0,5279
0,5	7 Tagen	0,6982

In einem Gemisch von 15 ccm Alkohol und 85 ccm Wasser schied bei 37° 1 g Samenpulver während 7 Tagen 0,4555 gr NH_3 ab aus 2 g Harnstoff.

Aus diesen Versuchswerten ergibt sich gleichmäßig eine Verzögerung der Ammoniakentwickelung durch die Gegenwart von Alkohol, die besonders auffallend bei der 15 % Alkohol enthaltenden Harnstoff-Lösung in die Erscheinung tritt. Durch Alkohol dürfte wohl das Ferment in seiner Tätigkeit ungünstig beeinflußt werden.

Zur Kontrolle ließ ich weiter eine reinwässerige Harnstofflösung derselben Konzentration mit 1 g Leinsamenmehl 7 Tage bei 37° stehen; dabei konnte ich überhaupt keine Ammoniak-Entwicklung beobachten.

4. Versuche der Isolierung der Urease.

a) durch Fällung mit Alkohol oder Aceton.

Ferner wurde nun versucht, das wirksame Prinzip der Samen, die Urease, zu isolieren, um so das reine Ferment auf seine Wirksamkeit prüfen zu können. 10 g des Samenpulvers entfettete man mit Aether, schüttelte sie mit 100 ccm Wasser 15 Minuten lang, filtrierte die Lösung ab und

fällte im Filtrate das Ferment durch Zusatz von Alkohol. Der erhaltene Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt und, noch feucht, in drei gleiche Teile geteilt. Jede dieser drei Portionen wurde sofort mit 2 g Harnstoff auf 100 ccm Wasser gelöst, diese Lösung verschiedene Zeiten bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen und sodann wie oben die Menge des durch die Harnstoffspaltung entstandenen Ammoniaks bestimmt. Diese wurde gefunden nach 1 tägiger Einwirkung gleich 0,1141 g, nach 5 tägiger Einwirkung gleich 0,405 g und nach 7 tägiger Einwirkung gleich 0,412 g.

Diese Zersetzung des Harnstoffes unter Entwicklung von Ammoniak beweist, daß die so aus den Samen erhaltene Substanz tatsächlich die Urease enthielt, wenn auch ihre Einwirkung auf Harnstoff geringer war als die der entsprechenden Mengen des Samenpulvers. Einmal wird bei dem Ausziehen mit Wasser wohl die Urease nicht vollkommen in Lösung gehen, dann erscheint auch durch eine Fällung mit Alkohol eine Schädigung des Fermentes nicht ausgeschlossen. Auf eine weitere Ursache der geringeren Wirkung soll später noch hingewiesen werden.

10 g des mit Aether entfetteten Samenpulvers wurden nun mit 50 ccm Wasser 2 Stunden lang geschüttelt, die Lösung abfiltriert und mit Alkohol im Ueberschuß versetzt. Der dabei ausgefallene und auf einem Filter gesammelte Niederschlag wurde nochmals mit 50 ccm Wasser aufgenommen und wieder mit Alkohol gefällt. Die Ausscheidung sammelte man wieder auf einem Filter, nahm sie dann ab und trocknete sie auf einem Tonteller. Sodann ließ ich sie auf eine Lösung von 2 g Harnstoff in 100 ccm Wasser 1 Tag bei 37^0 einwirken. Der Ammoniakgehalt der Lösung betrug sodann 0,65 g. Das Ergebnis dieses Versuches muß gleich dem der vorhergehenden gedeutet werden.

Auch nach einer Extraktion des fettfreien Samenpulvers (10 g) während 2 Tage bei 37° und Ausfällen des Fermentes aus der abfiltrierten Lösung durch Alkohol konnte der auf einem Tonteller getrocknete Niederschlag in 100 ccm einer zweiprozentigen Harnstofflösung während einer Einwirkung von 2 Tagen bei 37° nur 0,62 g NH_3 abspalten.

Man versuchte nun, das Ferment anstatt mit Wasser mit einer fünfprozentigen NaCl-Lösung herauszulösen, indem man 20 g des fettfreien Samenpulvers mit 100 ccm dieser Lösung 2 Stunden schüttelte, sodann abfiltrierte und mit Alkohol fällte. Der auf einem Filter gesammelte und nach der Loslösung vom Filter auf einem Tonteller im Vacuumexsiccator getrocknete Niederschlag schied in 100 ccm einer zweiprozentigen Harnstofflösung, während 2 Tagen bei 37° 0,7345 g NH_3 ab. Es hatte so die Verwendung der Salzlösung keinen erheblichen Unterschied verursacht gegenüber den Versuchen mit reinem Wasser.

Ein wesentlich anderes Resultat brachten die folgenden Untersuchungen.

10 g des ölfreien Pulvers zog ich mit 100 ccm einer fünfprozentigen Salzlösung einen Tag lang bei 37° aus und filtrierte sodann. 5 ccm des Filtrates (also = 0,5 g des Pulvers) oder ein Mehrfaches ließ ich 24 Stunden bei 37° einwirken auf eine Lösung von 2 g Harnstoff in 95 ccm Wasser und bestimmte sodann das dabei entstandene Ammoniak.

Es machten

5 ccm des Filtrates	0,2037 g
10 ccm des Filtrates	0,3426 g
15 ccm des Filtrates	0,5477 g
20 ccm des Filtrates	0,6206 g

Das günstige Ergebnis dieses Versuches zeigt, daß eine bedeutende Menge des harnstoffspaltenden Prinzips in die

Kochsalzlösung aus dem Samenpulver übergeht; diese dürfte aber an Wirksamkeit durch das Fällen mit Alkohol verlieren, abgesehen von den später noch zu erwähnenden Verlusten an Ferment im Laufe der Arbeit. Daß Fällungsmittel eine verschieden große Schädigung des Fermentes bewirken können, ergab sich, als Urease durch Aceton gefällt werden sollte.

10 g des fettfreien Samenpulvers zog ich mit einer Lösung von 2,5 g NaCl auf 50 ccm Wasser einen Tag bei 37° C. aus, das Filtrat versetzte ich im Ueberschuß mit Aceton, sammelte den Niederschlag auf einem Filter, trennte ihn davon und trocknete ihn im Vacuumexsiccator auf einem Tonteller. Das so erhaltene Ferment spaltete aus 100 ccm einer zweiprozentigen Harnstofflösung während 2 Tage bei 37° C. nur 0,0283 g NH_3 ab, bestimmt nach der oben angegebenen Methode. Das mit Aceton gefällte Ferment erwies sich noch bedeutend unwirksamer als das mit Alkohol gefällte. Dasselbe Resultat ergaben folgende Versuche:

Aus je 10 g des fettfreien Samenpulvers wurde wie oben durch Fällung einmal mit Alkohol, einmal mit Aceton das Ferment dargestellt und mit den getrockneten Niederschlägen 2 Tage lang eine zweiprozentige Harnstofflösung bei 37° behandelt. Dabei spaltete die Alkohol-Fällung 0,4373 g NH_3 ab, während durch die Aceton-Fällung überhaupt kein Ammoniak aus dem Harnstoff entwickelt wurde.

Außer auf den schädigenden Einfluß der Fällungsmittel ließ sich die so stark verminderte Wirksamkeit der freien Urease gegenüber der Wirksamkeit der entsprechenden Mengen des Samenpulvers auch durch eine ungenügende Auslösung des Fermentes aus dem Pulver erklären. Um zu prüfen, ob noch Ferment in wesentlichen Mengen in dem mit Wasser und Kochsalzlösung extrahierten Samenpulver zurückgeblieben war, ließ ich je 1 g dieser nach ihrer

Extraktion wieder getrockneten Pulver 2 Tage bei 37° C. auf eine Lösung von 2 g Harnstoff in 100 g Wasser einwirken. Nach der obigen Methode konnte ich bei dem mit reinem Wasser behandelten Samenpulver eine Ammoniakentwicklung = 0,4593 g nachweisen, bei dem mit Salzlösung behandelten eine solche von 0,4568 g, wodurch ein noch erheblicher Gehalt der Samen an Urease festgestellt war.

Ein wesentlicher Fehler bei der Herabsetzung der harnstoffspaltenden Kraft des aus den Samen isolierten Fermentes gegenüber der Wirksamkeit der entsprechenden Menge Samenpulvers dürfte der unvermeidliche Verlust an Ferment sein; sowohl bleibt bei der Loslösung der Urease vom Filter ein nicht unerheblicher Teil dort zurück, wie auch wohl an und in dem Tonteller Ferment haften bleibt. Ich schüttelte nun dreimal je 20 g Samenpulver mit einer Mischung von 20 g Alkohol und 180 g Wasser eine Stunde, filtrierte das Pulver und fällte aus dem Filtrat die Urease mit Alkohol. Die auf einem Filter gesammelten Niederschläge wurden noch feucht möglichst vollkommen vom Filter in Wasser aufgenommen und ihre Lösung auf 100 ccm aufgefällt. Von dieser Lösung ergänzte ich einmal 10 g, dann 20 und dann 50 ccm auf 100 ccm, versetzte diese erhaltenen Mischungen mit je 2 g Harnstoff und ließ die 2 Tage bei 37° stehen. Sodann wurde das entstandene Ammoniak nach der obigen Methode bestimmt und gefunden

nach der Einwirkung von 10 ccm der Urease-Lösung 0,4155 gr NH_3
„ „ „ „ 20 „ „ „ „ 0,6336 gr und
„ „ „ „ 50 „ „ „ „ 0,9565 gr.

Beim Vergleich dieser Versuche mit den obigen, bei denen das Ferment noch feucht mechanisch vom Filter losgelöst und sodann auf einem Tonteller getrocknet wurde, ergibt sich hier eine erhebliche stärkere Wirkung als oben, wodurch die Annahme bedeutender Verluste an Ferment

nach der ersteren Methode gerechtfertigt sein dürfte. Daher zog ich bei meinen weiteren Versuchen das letzte Verfahren vor.

Es wurden je 20 g des fettfreien Samenpulvers mit 200 ccm Wasser, das einmal mit 10 % und einmal mit 15 % Alkohol versetzt war, 1 Stunde geschüttelt, die Lösung abfiltriert und im Filtrat das Ferment mit 200 ccm Alkohol gefällt. Die auf einem Filter gesammelten Niederschläge löste man möglichst vollkommen auf 100 ccm Wasser. Einen verschieden großen Teil dieser Lösungen ergänzte man sodann mit Wasser auf 100 ccm, fügte 2 g Harnstoff hinzu, überließ das Gemisch 2, 4 oder 7 Tage bei 37° sich selbst und bestimmte dann das entstandene Ammoniak nach der früher angegebenen Methode.

	Verwendete Ferment-lösung	Dauer der Einwirkung	Gefundenes NH_3
Extraktion mit 10% Alkohol enthaltendem Wasser	10 ccm	2 Tage	0,3065 gr
	20 „	2 „	0,5722 „
	10 „	4 „	0,4777 „
	20 „	4 „	0,7899 „
	2,5 „	7 „	0,2299 „
	5 „	7 „	0,3048 „
Extraktion mit 15% Alkohol enthaltendem Wasser	10 ccm	2 Tage	0,1754 gr
	20 „	2 „	0,2897 „
	10 „	4 „	0,2810 „
	20 „	4 „	0,4726 „
	10 „	7 „	0,3891 „
	20 „	7 „	0,6046 „

Bei all den Versuchen, bei denen 15 % Alkohol enthaltendes Wasser zur Extraktion verwendet wurde, war so die Ammoniak-Entwicklung bedeutend geringer als bei den oben angeführten Parallelversuchen, bei denen nur 10 % Alkohol enthaltendes Wasser zur Extraktion diente. Der

Zusatz von Alkohol beim Ausziehen des Samenpulvers drückt zwar die harnstoffspaltende Kraft der Auszüge wesentlich herab. Schon nach dem Ergebnis früher ausgeführter Versuche mußte dem Alkohol eine Abschwächung des Fermentes zugeschrieben werden. Am vorteilhaftesten würde also reines Wasser zur Extraktion des Fermentes Verwendung finden. Dabei ergibt sich aber die mechanische Schwierigkeit, daß die rein wässerigen Auszüge sehr langsam und schwierig von dem Pulver abfiltrieren und trübe Filtrate liefern. Aus diesem Grunde erschien demnach der Alkohol-Zusatz bei den Auszügen nötig, da durch ihn die Filtration sehr erleichtert wurde.

Daß auch hier, wie das bei der Extraktion mit reinem Wasser und mit einer Kochsalzlösung bereits oben nachgewiesen ist, ein erheblicher Anteil des Fermentes in dem Drogenpulver zurückbleibt, zeigen folgende Versuche.

Je 1 g des mit 15 % Alkohol enthaltendem Wasser einmal ausgezogenen und wieder getrockneten Pulvers ließ man auf 2 g Harnstoff (in 100 ccm Wasser gelöst) verschiedene Zeiten bei 37° einwirken und bestimmte sodann das entstandene Ammoniak.

Bei einer Einwirkung

2 Tagen	0,5036 g NH_3
4 Tagen	0,8174 g NH_3
6 Tagen	1,0048 g NH_3

Wie schwer die Urease aus dem Drogenpulver sich ausziehen läßt, erläutern die weiteren Versuche:

20 g ölfreies Pulver wurden 4 Stunden mit 1000 ccm unter fortwährendem Umschütteln extrahiert; 1 g der auf einem Filter gesammelten und getrockneten Droge entwickelte in dieser Lösung von 2 g Harnstoff auf 100 g Wasser während 5 Tage bei 37° C. 0,9452 g NH_3.

Ein zweites Mal wurde ebenso anstatt mit reinem Wasser

mit einem Gemisch von 100 g Alkohol und 900 g Wasser ausgezogen. Bei Einwirkung von 1 g des extrahierten Pulvers auf 2 g Harnstoff unter denselben Bedingungen spalteten sich 0,81744 g NH_3 ab.

Selbst nach einem zweimaligen, dreitägigen Schütteln von 10 g fettfreien Samenpulver mit einem Gemisch von 10 g Alkohol und 90 g Wasser enthielt das Pulver noch erhebliche Mengen des Fermentes. 1 g desselben entwickelte aus einer Lösung von 2 g Harnstoff in 100 g Wasser während 7 Tagen bei 37° 0,8515 g NH_3. Diese noch stark harnstoffspaltende Kraft wiederholt extrahierten Samenpulvers läßt sich vielleicht durch die Annahme erklären, daß die Robiniensamen mindestens zwei harnstoffspaltende Fermente enthalten, die sich durch die verschiedene Löslichkeit in Wasser unterscheiden. Während das eine leicht mit Wasser extrahierbar ist, scheint das andere nicht in dieses überzugehen, sondern in dem Samenpulver zurückzubleiben.

Endlich zog ich zweimal je 20 g des ölfreien Samenpulvers mit einem Gemisch von 100 g Alkohol und 900 g Wasser 4 Stunden unter Umschütteln aus und dampfte die Filtrate im Vacuum bei 35° zur Trockene ein. 0,05 g des reinen Trockenrückstandes spalteten aus 2 g Harnstoff in wässeriger Lösung während 7 Tagen bei 37° C. 0,3151 g NH_3 ab, wodurch die Gegenwart von dem Harnstoff zersetzenden Ferment in dem Rückstande erwiesen war. Um es von anderen Beimengungen zu trennen, wurde der zweite Eindampf-Rückstand mit 100 g Wasser aufgenommen und aus dieser Lösung das Ferment durch Alkohol abgeschieden. 0,05 g des getrockneten Niederschlages entwickelten in einer zweiprozentigen Harnstofflösung während 14 Tagen bei 37° C. 0,87705 g NH_3.

Durch die Trennung von anderen Beimengungen beim Ausfällen mit Alkohol aus der wässerigen Lösung hat sich

zwar scheinbar die Wirksamkeit der aus den Samen isolierten Substanz etwas erhöht, doch steht sie der Wirksamkeit der entsprechenden Menge der Samen selbst noch bedeutend nach unter Berücksichtigung der in den Samen nach den Extraktionen noch zurückbleibenden Fermentanteile.

Daher erscheint die Ausfällung des Fermentes mit Alkohol aus den verschiedenen Auszügen des Samenpulvers nicht besonders geeignet zur Isolierung der Urease, weshalb es angebracht war, noch andere Fällungsmittel auf ihre Verwendbarkeit zu prüfen, nämlich Bleiacetat, Natriumchlorid und Ammoniumsulfat.

b) Durch Fällung mit Bleiacetat.

10 g Samenpulver schüttelte man mit einem Gemisch von 10 g Alkohol und 90 g Wasser 2 Tage bei 37° C., dampfte das Filtrat im Vacuum bei 35° C. zur Trockene ein und löste den Rückstand wieder auf 100 ccm Wasser. 5 ccm (0,5 g des Pulvers) dieser Lösung spalteten aus einer solchen von 2 g Harnstoff in 95 g Wasser während 10 Tage bei 37° 0,35703 g NH_3 ab.

50 ccm der Urease-Lösung (= 5 g Pulver) wurden mit Bleiacetatlösung im Ueberschuß gefällt, der Niederschlag von der Flüssigkeit durch Filtration getrennt und das Filtrat mit Wasser auf 100 ccm ergänzt. Nachdem 10 ccm desselben (= 0,5 g Pulver) 10 Tage lang auf 2 g Harnstoff eingewirkt hatten, waren nur 0,017 g NH_3 in dem Reaktionsprodukt nachweisbar.

Zu weiteren 50 ccm des Filtrates vom Bleiacetat-Niederschlag gab ich 10 ccm zehnprozentige Kochsalzlösung und filtrierte den erhaltenen Niederschlag ab. 12 ccm (= 0,5 g Pulver) des Filtrates spalteten gleichfalls nur 0,01763 g NH_3 aus 2 g Harnstoff in 88 ccm Wasser bei 37° während 10 Tage ab.

40 ccm des Filtrates vom Bleiacetat-Niederschlag versetzte ich mit Natriumsulfatlösung, sammelte das abgeschiedene Bleisulfat auf einem Filter und ergänzte das Filtrat mit Wasser auf 60 ccm. 15 ccm dieser Lösung (= 0,5 g Pulver) lieferten mit 2 g Harnstoff und 85 ccm Wasser während 10 Tagen bei 37° gleichfalls nur 0,017 gr NH_3.

Diese bei den drei Versuchen beobachtete sehr geringe Ammoniak-Abspaltung bewies eine beinahe vollkommene Ausfällung des Harnstoff spaltenden Prinzipes durch das Bleiacetat aus der wässerigen Ureaselösung. Ich fällte nochmals eine ebenso wie oben bereitete Lösung der Urease mit Bleiacetat, verrieb den auf einem Filter gesammelten Niederschlag mit 40 ccm Wasser, schied das Blei vollkommen als Sulfid mit Schwefelwasserstoff ab und filtrierte. Aus dem Filtrat wurde mittels Durchleiten von Luft der Schwefelwasserstoff ausgetrieben, und dieses sodann mit Wasser auf 100 ccm ergänzt. Nach Zusatz von 2 g Harnstoff entwickelte sich in dieser Lösung während 3 Tagen bei 37° kein Ammoniak. Ein zweiter ebenso durchgeführter Versuch ergab gleichfalls ein negatives Resultat.

Bleiacetat erscheint somit nicht brauchbar zur Isolierung der Urease, wenn es auch letztere ziemlich quantitativ aus ihrer wässerigen Lösung abscheidet.

c) Durch Fällung mit Natriumchlorid.

10 g Samenpulver schüttelte ich 1 Stunde mit 100 ccm Wasser, filtrierte und versetzte das Filtrat mit NaCl im Ueberschuß. Den auf einem Filter gesammelten Niederschlag nahm ich mit 30 ccm Wasser auf und ließ je ein Drittel dieser Lösung (= etwa 3,3 g Pulver) auf eine solche von 2 g Harnstoff in 90 g Wasser verschiedene Zeiten bei 37° einwirken. Nach einem Tage waren abgespalten 0,10218 g NH_3, nach 3 Tagen 0,22991 g NH_3 und nach

6 Tagen 0,3406 g NH_3. Die Ergebnisse der Versuche mit Kochsalz sind zwar günstiger als die mit Bleiacetat, kommen aber denen der folgenden Versuche mit Ammoniumsulfat noch nicht gleich.

d) Durch Fällung mit Ammoniumsulfat

10 g des Samenpulvers wurden mit 100 g Wasser 1 Stunde geschüttelt, die Extraktion abfiltriert und mit Ammoniumsulfat im Ueberschuß versetzt. Den auf einem Filter gesammelten Niederschlag nahm man mit 30 ccm Wasser auf und ließ je ein Drittel dieser Lösung (etwa = 3,3 g Pulver) auf eine solche von 2 g Harnstoff in 90 g Wasser verschiedene Zeiten bei 37° einwirken.

Nach einem Tage waren abgespalten 0,18733 g NH_3, nach 3 Tagen 0,43421 gr NH_3 und nach 6 Tagen 0,7153 g NH_3.

Nochmals zog ich 6 g Samenpulver mit 100 g Wasser unter einstündigem Umschütteln aus und nahm den aus dem Filtrat durch $(NH_4)_2SO_4$ gefällten Niederschlag mit 60 ccm Wasser wieder auf. Je 5 oder 10 ccm dieser Lösung füllte ich auf 100 ccm mit Wasser auf, setzte 2 g Harnstoff zu und überließ das Reaktionsgemisch verschiedene Zeiten bei 37° sich selbst. Nach Beendigung der Einwirkung waren an Ammoniak abgespalten:

bei Verwendung von 5 ccm Fermentlösung (= 0,5 g Pulver)

nach 3 Tagen	0,0852 g
nach 5 Tagen	0,12773 g
nach 7 Tagen	0,1703 g

bei Verwendung von 10 ccm Fermentlösung (= 1,0 g Pulver)

nach 3 Tagen	0,1277 g
nach 5 Tagen	0,2044 g
nach 7 Tagen	0,2555 g.

Ammoniumsulfat gibt zwar ein günstigeres Ergebnis als Bleiacetat und Natriumchlorid; dennoch ist dieses noch schlechter als das bei gleichen Versuchen mit Alkohol erhaltene. Da auch letzteres unbefriedigend war, erscheint die Isolierung der Urease aus den Robiniensamen nur mit einem sehr erheblichen Verluste oder Rückgang ihrer Wirksamkeit möglich.

5. Versuche über die Ausziehbarkeit der Urease mit verschiedenen Salzlösungen.

Im weiteren Verlauf meiner Arbeit stellte ich Untersuchungen an über den Uebergang der Urease aus dem Samenpulver in die Lösungen verschiedener Salze. Es war so die Möglichkeit gegeben, eine für die Extraktion des Fermentes besonders geeignete Salzlösung aufzufinden. Je 1 gr des Samenpulvers schüttelte ich eine Stunde mit einer Salzlösung 1:20, filtrierte sodann ab, wusch den Filterrückstand noch mit 10 ccm Wasser nach und ließ das Filtrat auf 2 g Harnstoff 4 Tage bei 37° einwirken. Nach Beendigung dieser Reaktion bestimmte ich die Menge des abgespaltenen Ammoniaks.

Bei Verwendung von	wurde gefunden gr NH_3
$CaCl_2$	0,085
$MgCl_2$	0,145
KNO_3	0,247
Na_2HPO_4	0,412
$NaOOCCH_3$ I. Versuch	0,4428
II. „	0,469

Zur Kontrolle wurden Lösungen von 1 g der Salze und 2 g Harnstoff auf 30 ccm Wasser ebenfalls 4 Tage bei 37° C. stehen lassen. Dabei war eine Ammoniakentwicklung nicht zu beobachten, so daß eine Täuschung durch

eine solche bei den obigen Versuchen ausgeschlossen erschien. Am meisten nimmt unter den zur Extraktion verwendeten Salzlösungen scheinbar die Natriumacetatlösung von dem Ferment auf. Vielleicht muß die bei den einzelnen Salzlösungen beobachtete verschiedene Wirkung auf Harnstoff zum Teil auch zurückgeführt werden auf einen mehr oder minder schädigenden Einfluß des betreffenden Salzes auf das Ferment, also auf eine Herabsetzung seiner harnstoffspaltenden Kraft durch das Salz.

6. Ueber den Einfluß des Erwärmens auf die Urease

Es waren noch Untersuchungen dahin nötig, ob durch Erwärmen der Uebergang der Urease aus dem Samenpulver in das zur Extraktion verwendete Wasser erleichtert wird. Es wurden je 1 g Samenpulver mit 40 ccm Wasser 1 Stunde auf dem Wasserbade auf verschiedene Temperaturen erwärmt, nach dem Erkalten 2 g Harnstoff zugegeben und dann das Gemisch 3 Tage bei 37° C. sich selbst überlassen. Hiernach bestimmte man die Menge des durch die Harnstoffzerlegung entstandenen Ammoniaks.

Es wurden gefunden:

ohne Vorerwärmen:	0,8095 g NH_3
nach dem Vorerwärmen:	
auf 45° C.	0,8755 g NH_3
auf 50° C.	0,7919 g NH_3
auf 60° C.	0,6277 g NH_3
auf 70° C.	0,413 g NH_3
auf 80° C.	0,017 g NH_3

Das Erwärmen auf 45° C. scheint somit den Uebergang des Fermentes aus dem Samenpulver in das Wasser zu begünstigen, während beim Erhitzen auf höhere Tem-

peraturen die Urease wohl eine Schädigung erleidet. Auf diesen Umstand dürfte besonders die geringe Ammoniakentwicklung nach dem Erwärmen auf 80° C. zurückzuführen sein.

Zur Beachtung der Einwirkung der verschiedenen Temperaturen auf das gelöste Ferment schüttelte man 1 g des Samenpulvers mit einem Gemisch von 30 ccm Alkohol und 270 ccm Wasser 3 Stunden lang, filtrierte und erhitzte sodann das Filtrat allmählich bis auf 80° C. Bei 45° C. begann bereits die Abscheidung von eiweißartigen Stoffen, bei 80° C. war sie beendet. Daß aber doch selbst bei 80° C. die Fermentlösung nicht gänzlich unwirksam wird, zeigt noch folgender Versuch: 10 g Pulver zog ich mit einem Gemisch von 10 g Natriumacetat, 30 ccm Alkohol und 260 ccm Wasser 3 Stunden unter Umschütteln aus. Das Filtrat erhitzte ich eine Stunde auf 80° C. und filtrierte von den dabei ausfallenden Eiweißstoffen abermals ab. 100 ccm dieses Filtrates spalteten noch aus 2 g Harnstoff während 4 Tagen bei 37° C. 0,085 g NH_3 ab. Auch die beim Erhitzen entstandene Ausfällung entwickelte noch 0,0760 g NH_3 aus einer Lösung von 2 g Harnstoff in 100 ccm Wasser während 4 Tage bei 37° C.; durch das einstündige Erhitzen auf 80° C. wurde also die harnstoffspaltende Substanz noch nicht vollkommen unwirksam, wenn sie auch an Wirksamkeit ganz bedeutend verloren hatte.

7. Ueber die Spaltbarkeit von Alkylderivaten des Harnstoffes durch das Samenpulver.

1 g des Samenpulvers ließ ich 5 Tage bei 37° C. auf eine Lösung von 2 g asymmetrischem Dimethylharnstoff in 100 ccm Wasser einwirken, sodann leitete ich 3 Stunden lang bei 80° C. Luft durch das Reaktionsprodukt und hinterher durch verdünnte Salzsäure, um in dieser vielleicht über-

destillierende basische Stoffe zu binden. Die vorgelegte Säure wurde auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit etwas Alkohol aufgenommen, die Lösung filtriert und wieder auf dem Wasserbade eingedampft. Den neuen Rückstand löste ich in Chloroform und verdampfte dies nach der Filtration wiederum. Aus einer Lösung des Chloroform-Rückstandes in wenig Alkohol schied sich nach Zusatz von Platinchlorid und Konzentrieren durch Eindampfen ein kristallinischer Niederschlag ab, den man auf einem Filter sammelte. Nach dem Trocknen hinterließen 0,1694 desselben beim Glühen 0,067 g Platin.

Für $(NH_2(CH_3)_2)_2PtCl_6$:
Ber.: 39,01 % Pt.
Gef.: 39,5 % Pt.

Der auf Zusatz von Platinchlorid ausgeschiedene Niederschlag bestand daher aus der Platinchloridverbindung des Dimethylammoniumchlorids. Da bei einem ebenso, aber ohne Samenpulver ausgeführten blinden Versuch nur Spuren eines nicht näher charakterisierbaren, in Chloroform löslichen Stoffes erhalten wurden, also hier eine Abspaltung von Dimethylamin nicht zu beobachten war, ließ das beim ersten Versuch gefundene Dimethylamin wohl auf eine Zerlegung des asymmetrischen Dimethylharnstoffes durch die Urease schließen.

Auch nach der Einwirkung von 1 g Samenpulver auf eine Lösung von 2 g asymmetrischen Diäthylharnstoff konnte nach derselben Weise eine Platinverbindung abgeschieden werden, die beim Glühen von 0,1134 g einen Rückstand von 0,04 g ergab.

Für $(NH_2(C_2H_5)_2)_2PtCl_6$:
Ber.: 35,08 Pt.
Gef.: 35,27 Pt.

So war auch hier durch die Urease Diäthylamin abgespalten worden; bei einem ebenso durchgeführten blinden Versuch ohne Samenpulver ließen sich nur Spuren eines in Chloroform löslichen, nicht näher charakterisierbaren Stoffes abscheiden.

Bei einer Einwirkung von 1 g Samenpulver auf eine Lösung von 2 g symmetrischem Dimethylharnstoff und Diäthylharnstoff konnte nach derselben Methode eine Platinchloridverbindung in solcher Menge, daß sie näher charakterisierbar war, nicht isoliert werden.

Während asymmetrischer Dimethylharnstoff und Diäthylharnstoff durch die Urease der Robiniensamen unter Abscheidung der Amine zerlegt werden, konnte eine solche Zerlegung bei den entsprechenden symmetrischen Alkylderivaten des Harnstoffes nicht beobachtet werden. —

Ergebnisse der Arbeit.

Durch meine vorstehend mitgeteilten Untersuchungen konnte ich das ursprünglich von Zemplén angegebene Verfahren der Wirksamkeitsbestimmung der Urease derart verbessern, daß die ihm bisher anhaftenden Fehler beseitigt wurden. Einmal unterließ ich im Gegensatz zu Zemplén den Zusatz von Kalziumhydroxyd. Ferner destillierte ich das Ammoniak aus der Harnstofflösung, nach der Urease-Einwirkung nicht wie Zemplén durch Kochen der Reaktionsflüssigkeit über, sondern durch zweistündiges Durchleiten von Luft bei der Temperatur von 80° C. Wie meine Untersuchungen ergaben, liefert diese Methode gute Resultate. Ebenso sicher und bedeutend einfacher kann aber auch das bei der Harnstoffzerlegung gebildete Ammoniak direkt durch Titration mit Normal-Schwefelsäure unter Verwendung von Dimethylaminoazobenzol als Indikator bestimmt werden. Daß

die Gegenwart von unzersetztem Harnstoff diese Titration nicht stört, konnte ich experimentell feststellen.

Mit Hilfe dieser beiden Methoden wurde die Harnstoff spaltende Kraft der Robiniensamen nachgewiesen und somit die Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigt. Ich konnte sodann weiter feststellen, daß die Menge des bei der Harnstoffspaltung entstandenen Ammoniaks mit der Menge des einwirkenden Samenpulvers und der Dauer der Einwirkung proportional anstieg. Weiter wurde von mir ermittelt, daß die Harnstoffzerlegung beim Erhöhen der Versuchstemperatur auf 37° C eine Beschleunigung erfährt.

Meine Bemühungen, ein vollwertiges Verfahren einer Isolierung der Urease aus dem Samenpulver zu ermöglichen, führten zu keinem befriedigenden Resultat. Am geeignetsten erscheint noch die Fällung des Fermentes aus einem wässerigen Auszug des Samenpulvers mit Alkohol, obwohl Alkohol an sich schon eine Schädigung des Enzymes bewirkt. Noch weniger sind als Fällungsmittel brauchbar Bleiacetat, Natriumchlorid und Ammoniumsulfat.

Bei der Einwirkung verschiedener Salzlösungen der gleichen Konzentration zeigte eine Lösung von Natriumacetat die stärkste harnstoffspaltende Wirkung; sie dürfte somit die größte Menge Ferment aus dem Samenpulver aufgenommen haben. Reines Wasser löst das Enzym am besten aus dem Pulver bei 45° C; beim Erwärmen auf höhere Temperatur sinkt die Wirksamkeit der Extraktionsflüssigkeit und hört bei 80° C fast auf.

Es ist die harnstoffspaltende Substanz der Robiniensamen nur zum Teil in Wasser löslich, während ein erheblicher Anteil auch nach wiederholter Extraktion in dem Samenpulver zurückbleibt. Daher hat es den Anschein, als ob die Robiniensamen zwei harnstoffspaltende Enzyme enthalten, die sich durch ihre physikalischen Eigenschaften, so durch ihre Löslichkeit in Wasser, unterscheiden.

Während bisher eine Einwirkung der Urease auf ver-

wandte Verbindungen des Harnstoffs nicht beobachtet wurde, kam eine solche wohl der Robinienurease zu für asymmetrischen Dimethyl- und Diäthylharnstoff. Die entsprechenden symmetrischen Verbindungen des Harnstoffs scheinen durch die Robinienurease keine merkliche Zerlegung zu erfahren.

Zur Ausführung dieser Arbeit wurde ich angeregt durch den Direktor des Pharmazeutischen Instituts der Universität Berlin, Herrn Geheimrat Prof. Dr. H. Thoms.

Es sei mir gestattet, Herrn Geheimrat auch an dieser Stelle für diese Anregung, ganz besonders aber für das mir stets bewiesene Wohlwollen meinen ehrerbietigsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf

Am 18. Mai 1881 wurde ich, P i n Y i n Y i, geboren zu Shanghai als Sohn eines Großkaufmanns. 1904 wurde ich von der Provinzialbehörde zu Kiangsu zu Studienzwecken nach Japan entsandt, bestand dort 1908 auf dem Gymnasium zu Osaka die Absolutorialprüfung und wurde im selben Jahre auf der Medizinischen Spezialschule, pharmazeutische Fakultät, zu Nagasaki immatrikuliert. Hier erwarb ich 1911 den Doktortitel und kehrte sodann nach China zurück, wo ich von 1912—1914 als Lehrer für Chemie an der Spezialschule für Medizin in Kiangsu tätig war. Im Frühjahr 1914 ging ich auf Veranlassung der Provinzialbehörde von Kiangsu zu Studienzwecken nach Deutschland, wurde hier an der Universität Berlin immatrikuliert kehrte aber nach Kriegsausbruch wieder nach China zurück. 1916 kam ich neuerdings nach Deutschland und setzte meine Studien an der Universität Berlin fort. Hauptsächlich widmete ich mich dem Studium der Chemie und Pharmazie und führte im Pharmazeutischen Institut der Universität Berlin die Untersuchungen „Ueber die Urease der Samen von Robinia pseudacacia“ aus. Ich besuchte die Vorlesungen und Uebungen der Herren Professoren: Engler, Großmann, Haberlandt, Stumpf, Thoms, Wehnelt, Wichelhaus. Meinen hochverehrten Lehrern spreche ich meinen aufrichtigsten Dank aus. Die Promotionsprüfung bestand ich am 6. Oktober 1919.